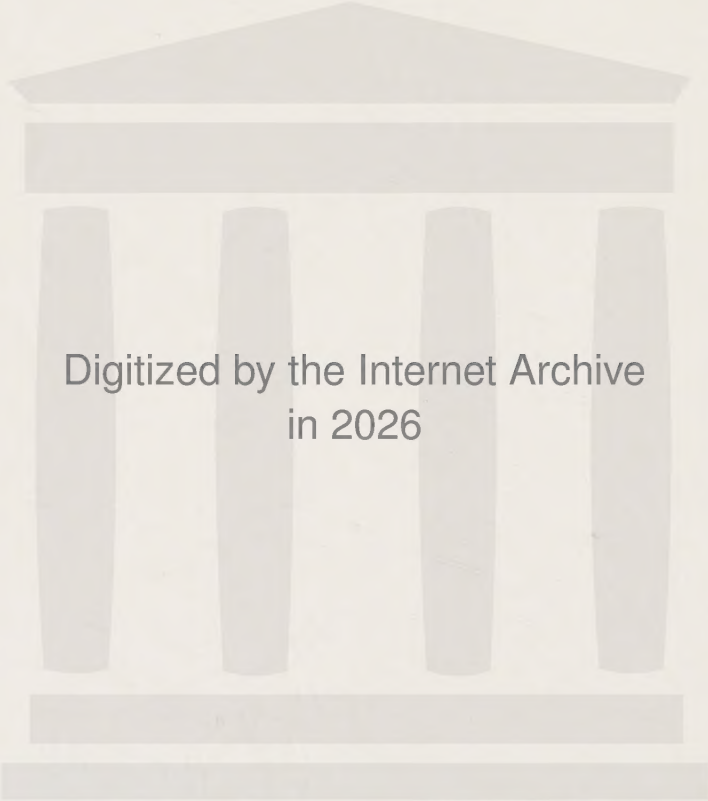


Hochdosierte Methotrexat-Therapie beim osteogenen
Sarkom im Kindesalter: Pharmakokinetische Unter-
suchungen mit einem spezifischen Radioimmunoassay

Herbert Wiesner

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus B e t k e

Hochdosierte Methotrexat-Therapie beim osteogenen
Sarkom im Kindesalter: Pharmakokinetische Unter-
suchungen mit einem spezifischen Radioimmunoassay

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Herbert W i e s n e r
aus
München

1981



Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter:	PD Dr. F.Bidlingmaier
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.med.K.Betke
Dekan:	Prof. Dr.med.W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.1981

1.	EINLEITUNG	1
2.	GRUNDLAGEN	2
2.1.	Wirkungsmechanismus von Methotrexat	2
2.2.	Aufhebung der MTX-Toxizität durch Citrovorum-Faktor (CF-rescue)	6
2.3.	Pharmakokinetik des MTX	7
3.	KLINISCHE THERAPIE MIT MTX	9
4.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	10
4.1.	Patienten und Versuchsprotokoll	10
4.2.	MTX-Bestimmung	11
4.2.1.	Grundlagen der Methode	11
4.2.2.	Material	13
4.2.3.	Durchführung	15
4.3.	Vorversuche und Kontrollen	16
4.3.1.	Verdünnungsfaktor des Antiserums	16
4.3.2.	Inkubationsbedingungen	18
4.3.3.	Spezifität des Antiserums	20
4.3.4.	Reproduzierbarkeit der Methode	21
4.4.	Ergebnisse	22
4.4.1.	Der Normbereich	22
4.4.2.	Korrelation der Plasma-MTX-Konzentrationen mit dem klinischen Verlauf	25
4.4.3.	Serumkreatininspiegel und MTX-Toxizität	28
5.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	30
5.1.	Zum Normbereich	30
5.2.	Serumkreatinin und MTX-Toxizität	33
5.3.	Leitlinien zur Behandlung	33
5.4.	Zur Leukovorin-Therapie	34

6. ZUSAMMENFASSUNG

7. LITERATURVERZEICHNIS

39

1. EINLEITUNG

Die Prognose des osteogenen Sarkoms im Kindesalter hat sich durch die Einführung der adjuvanten Chemotherapie entscheidend gebessert. Während nach alleiniger chirurgischer Behandlung des osteogenen Sarkoms eine rezidivfreie Überlebensrate nach zwei Jahren von 17% berichtet wurde (20), werden jetzt mit zusätzlicher adjuvanter Chemotherapie rezidivfreie Überlebensraten zwischen 60% und 80% erreicht (16, 26).

Mit der adjuvanten Chemotherapie wird vor allem das Ziel verfolgt, die Entwicklung von Lungenmetastasen, die die häufigste Todesursache darstellen (20), zu verhindern. Dabei geht man von der Vorstellung aus, daß in einem großen Prozentsatz der Fälle zum Zeitpunkt der Diagnose bereits klinisch nicht faßbare Mikrometastasen vorhanden sind (31).

Die adjuvante Chemotherapie wird am häufigsten als Kombinationstherapie mehrerer Zytostatika durchgeführt. Unter den angewandten Chemotherapeutika hat das Methotrexat (MTX) in hoher Dosierung die größte Bedeutung (17).

Bei der hochdosierten Methotrexattherapie handelt es sich um eine nicht ungefährliche Therapie: Eine Anzahl zum Teil lebensbedrohlicher toxischer Erscheinungen kann bei verzögerter MTX-Ausscheidung auftreten: Knochenmarksdepression, Schleimhautulzerationen in Mund und Gastrointestinaltrakt, Nierenschädigungen, Leberzellschaden und Dermatitis (3). Eine kürzlich angefertigte Übersicht aus dem National Cancer Institute, USA, belegte 29 Todesfälle bei 498 Patienten (6%), die direkt auf eine MTX-Toxizität zurückzuführen waren. Todesursache war bei 23 Patienten

eine schwere Knochenmarksdepression mit Sepsis oder hämorrhagischer Diathese, bei 6 Patienten Nierenversagen (9).

MTX wird zum überwiegenden Teil über die Nieren ausgeschieden. Eine durch MTX bedingte Nierenschädigung kann zu einer Verzögerung der MTX-Ausscheidung führen. Die Nierenschädigung wird durch eine Ausfällung von MTX in der Niere hervorgerufen (22). Ein saures Milieu begünstigt den Ausfall von MTX. Durch Alkalinisierung während der hochdosierten MTX-Therapie kann man dem zwar entgegenwirken (22), doch lassen sich toxische Verläufe dadurch nicht sicher vermeiden.

Aus der Schwere der toxischen Nebenwirkungen ergibt sich die Notwendigkeit, eine verzögerte MTX-Elimination rechtzeitig zu erfassen. Eine Möglichkeit, die MTX-Elimination aus dem Plasma zu kontrollieren, besteht in der Bestimmung der Plasma-MTX-Konzentrationen nach MTX-Gabe.

In der vorliegenden Arbeit wird eine spezifische und praktikable Methode zur raschen Messung der MTX-Spiegel im Plasma beschrieben. Es werden mit ihr gewonnene Daten über die Elimination des MTX aus dem Blut mitgeteilt, aus denen ein Schema für die Überwachung der Blutspiegel bei der Behandlung des osteogenen Sarkoms abgeleitet wurde. Zusätzlich soll ein Überblick über die Grundlagen der hochdosierten Methotrexattherapie gegeben werden.

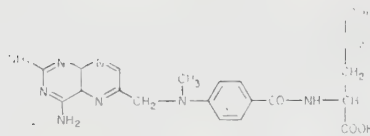
2. GRUNDLAGEN

2.1. Wirkungsmechanismus von MTX

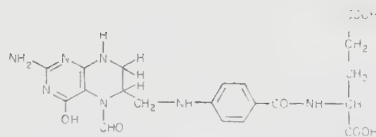
Die Wirkung des Folsäureantagonisten MTX (Abb.1) beruht auf der festen, aber reversiblen Bindung von MTX an das Enzym Dihydrofolsäurereduktase. Dadurch wird die Reduktion von Folsäure in die biochemisch wirksame Tetrahydrofol-

säure gehemmt (3) (Abb.2).

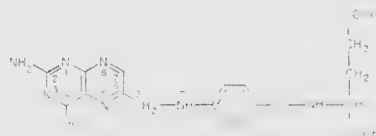
Tetrahydrofolsäure wirkt als Koenzym beim Transfer von C_1 -Bruchstücken und ist damit beteiligt an der Synthese von Thymidinmonophosphat und Inosinsäure. Thymidinmonophosphat ist das für DNS spezifische Nukleotid, Inosinsäure ist als Purinvorläufer für die DNS- und RNS- Synthese notwendig (3) (Abb. 2).



MTX



CF



FS

Abb.1: Strukturformeln von Methotrexat (MTX), Citrovorum-Faktor (CF) und Folsäure (FS).

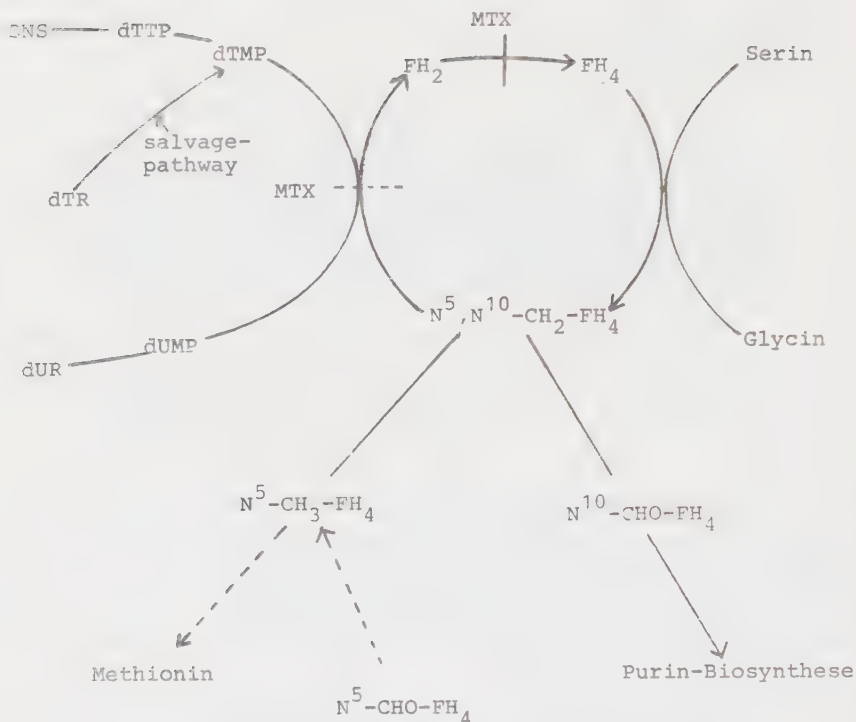


Abb. 2: Darstellung des Folsäurezyklus, der Angriffspunkte von Methotrexat und des "salvage-pathway"

Abkürzungen:

FH ₂	Dihydrofolsäure
FH ₄	Tetrahydrofolsäure
dUR	Deoxyuridin
dUMP	Deoxyuridinmonophosphat
dTR	Thymidin
dTMP	Thymidinmonophosphat
dTTP	Thymidintriphosphat
N ⁵ ,N ¹⁰ -CH ₂ -FH ₄	5-10-Methylen-Tetrahydrofolsäure
N ⁵ -CH ₃ -FH ₄	5-Methyl-Tetrahydrofolsäure
N ⁵ -CHO-FH ₄	5-Formyl-Tetrahydrofolsäure (Citrovorum-Faktor)
N ¹⁰ -CHO-FH ₄	10-Formyl-Tetrahydrofolsäure

Im menschlichen Leukozyten wird durch MTX die DNS-Synthese stärker gehemmt als die RNS-Synthese. Die Hemmung der Synthese von Thymidinmonophosphat ist hiermit der für die Zelltoxizität von MTX entscheidende Mechanismus (10).

MTX greift in hohem Maße spezifisch während der S-Phase an, seine Wirkung ist somit abhängig vom Zellzyklus (3). Daraus läßt sich ableiten, daß MTX vor allem Gewebe mit hoher Zellteilungsrate (Tumoren, Knochenmark, Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes) schädigt.

Aus der Verminderung der Thymidinmonosphosphat-Bildung über Uridinmonophosphat in der durch MTX geschädigten Zelle resultiert eine vermehrte Bildung von Thymidinmonophosphat aus Thymidin (Abb.2); die Steigerung dieser Reaktion, die durch Zunahme der Aktivität der Thymidin-Kinase bewirkt wird, wird auch als "salvage pathway" bezeichnet. Die Zunahme der Thymidin-Kinase-Aktivität resultiert aus der verminderten Rückkopplungshemmung durch Thymidintriphosphat (32).

Darüber hinaus wirkt Tetrahydrofolsäure als Koenzym bei Reaktionen im Aminosäure-Stoffwechsel (Umwandlung von Glycin in Serin, Homocystein in Methionin) (Abb.2). Durch die Reduzierung des Angebotes an Tetrahydrofolsäure wirkt MTX somit auch direkt auf die Proteinsynthese hemmend (3). Dieser Mechanismus könnte die Grundlage dafür sein, daß MTX Zellen in der G_1 -Phase des Zellzyklus "anhält". Das Eintreten in die S-Phase wird dadurch verhindert; damit könnte die zelltötende Wirkung von MTX, die spezifisch auf die S-Phase begrenzt ist, einen selbst-limitierenden Effekt erfahren (3).

Es wurde gezeigt, daß MTX durch ein Carrier-System, das

auch vom Citrovorum-Faktor (Abb.1) und 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure benutzt wird, aktiv in die Zelle transportiert wird (8). Damit wirkt MTX auch durch kompetitive Hemmung des Transports von reduzierter Folsäure in die Zelle.

Das oben genannte Carrier-System scheint bei den Zellen einiger Tumorarten (z.B. Osteosarkom) zu fehlen. Das Fehlen dieses Transportsystems könnte Ursache dafür sein, daß diese Tumoren auf MTX in niedriger Dosierung unempfindlich sind. Ein Ansprechen dieser Tumorarten wird nur durch die hochdosierte Methotrexattherapie bewirkt (7).

Als weiterer Wirkungsmechanismus von MTX wurde die direkte Hemmung des Enzyms Thymidinmonophosphat-Synthetase vermutet (2). Im Gegensatz zur Hemmung der Dihydrofolsäure-reduktase werden hierbei höhere MTX-Konzentrationen (über 10^{-5} mol/l) benötigt. Trotzdem könnte bei der hochdosierten Methotrexattherapie daraus eine weitere Hemmung der DNS-Synthese resultieren (2).

2.2. Aufhebung der MTX-Toxizität durch Citrovorum-Faktor (CF-rescue)

Bei der hochdosierten Methotrexattherapie wird im Anschluß an die MTX-Applikation Citrovorum-Faktor (CF, = 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure) (Abb.1) gegeben. Der Zeitraum zwischen MTX-Gabe und CF-Gabe, die Dauer der CF-Therapie und ihre Dosierung werden unten diskutiert.

Mit der CF-Gabe nach der hochdosierten Methotrexattherapie wird das Ziel verfolgt, die MTX-Wirkungen an Körpergeweben mit hohem Zellumsatz (besonders Knochenmark und Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes) aufzuheben, ohne dabei die zelltötende Wirkung von MTX an der Tumorzelle zu beeinträchtigen.

Zur Erklärung der Selektivität der CF-rescue wird vermutet, daß Zellen einiger Tumorarten (u.a. Osteosarkom), die gegen niedrige MTX-Dosen unempfindlich sind, u.a. o.g. Carrier-System für MTX und damit auch für CF nicht besitzen (7). Bei hohen extrazellulären MTX-Konzentrationen könnten dann allein durch passive Diffusion von MTX in die Zelle wirksame MTX-Konzentrationen in den Tumorzellen erreicht werden. Der im Anschluß daran in niedriger Dosierung gegebene CF hingegen kann nur in Zellen mit aktivem Transportsystem wirksam werden (8, 7).

Vorläufige Daten sprechen dafür, daß in normalen Knochenmarkszellen die DNS-Synthese durch CF wieder in Gang kommen kann, in Tumorzellen hingegen nicht (7). Inwieweit CF dabei ausschließlich normale Zellen "rettet", bleibt unsicher.

CF wird nach seiner Applikation in 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, den hauptsächlich wirksamen Metaboliten der reduzierten Folsäure im menschlichen Körper, umgewandelt. 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure wird weiter metabolisiert zu N_5, N_{10} -Methylen-Tetrahydrofolsäure oder zu Tetrahydrofolsäure. Diese beiden Metaboliten treten in den Folsäurezyklus unter Umgehung des Enzyms Dihydrofolsäurereductase, das durch MTX blockiert ist, ein. CF führt auf diesem Wege direkt der Zelle reduzierte Folsäure zu (2) (Abb.2).

2.3. Pharmakokinetik des MTX

Nach intravenöser Applikation verteilt sich MTX schnell im Extrazellulärraum, danach im Gesamtkörperwasser. Die MTX-Elimination aus dem Plasma ist 3-phasisch.

Die erste Phase weist eine Halbwertszeit von $0,75 \pm 0,11$ Stunden, die zweite eine Halbwertszeit von $3,49 \pm 0,55$

Stunden und die dritte Phase eine Halbwertszeit von $26,99 \pm 4,44$ Stunden auf (12).

Die erste Phase entspricht wahrscheinlich der Verteilung im Extrazellulärraum und im Gesamtkörperwasser, die zweite Phase der Ausscheidung und die dritte Phase u.U. einem enterohepatischen Kreislauf von MTX (3, 12).

Der größte Teil wird jedoch über die Nieren ausgeschieden. Die lange Exposition der Zellen gegenüber MTX während der dritten Phase der MTX-Elimination wird für einen großen Teil der toxischen Nebenwirkungen auf Knochenmark, Gastrointestinaltrakt und Nieren verantwortlich gemacht (3, 4).

Neuere Studien haben ergeben, daß MTX während seines enterohepatischen Kreislaufes einem Metabolismus durch Einwirkung von Bakterien des Intestinaltraktes unterworfen ist (30). Ein Metabolit, 7-Hydroxy-Methotrexat könnte dadurch klinische Bedeutung besitzen, daß er eine 4-fach geringere Löslichkeit im Urin besitzt und durch Präzipitation z.T. für die Nephrotoxizität verantwortlich sein könnte (14).

Für die Entstehung einer schweren Knochenmarksdepression ist nicht so sehr die Höhe der erreichten MTX-Konzentration entscheidend, sondern vor allem die Länge der Exposition gegenüber einer kritischen minimalen Plasma-MTX-Konzentration, der sogenannten Konzentrationsschwelle. Diese Zeitspanne wird mit 42 Stunden angegeben (18), der kritische Schwellenwert für Knochenmark und Gastrointestinaltrakt mit 2×10^{-8} mol/l (4).

Als Ursache einer verzögerten MTX-Ausscheidung kann meist eine Nierenschädigung angenommen werden. Ihre Häufigkeit läßt sich durch eine adäquate Hydrierung und Alkalinisierung des Patienten vor, während und nach der MTX-Applikation reduzieren (22). Außerdem können eine

Rückdiffusion aus Exsudaten (z.B. Pleuraerguß) oder die Rezirkulation über den enterohepatischen Kreislauf eine Rolle spielen (3).

3. KLINISCHE THERAPIE MIT MTX

1947 und 1948 wurde von Sidney Farber et al. zum ersten Mal ein Folsäureantagonist, das Aminopterin, erfolgreich bei der Therapie der Leukämie eingesetzt (6).

1949 wurde das weniger toxische Amethopterin (MTX) eingeführt.

Seit der ersten klinischen Anwendung 1953 haben die eingesetzten MTX-Dosen eine ständige Steigerung erfahren.

1966 und 1967 setzte Djerassi et al. erstmalig verschiedene Behandlungsschemata mit hochdosiertem MTX und CF-rescue bei Leukämien ein (5).

Hryniuk und Bertino wandten 1969 hochdosiertes MTX mit CF-rescue bei Leukämien in 24-Stunden-Infusionen an (11).

Jaffe et al. begann 1974 die hochdosierte MTX-Therapie mit CF in 6-Stunden-Infusionen beim Osteosarkom (15).

Derzeit kommt MTX in drei verschiedenen Behandlungsformen zur Anwendung:

1. Konventionelle niedrige Dosierung ohne CF
2. Hochdosierte systemische Anwendung mit CF
3. Intrathekale Therapie.

Die hochdosierte MTX-Therapie mit CF-rescue, auf die im Folgenden eingegangen werden soll, wird auf zwei Arten durchgeführt:

1. Als intravenöse Bolus-Applikation (über 4 bis 6 Stunden) mit einer Dosis von 1 bis 10g/m^2 Körperoberfläche und mehr.
2. Als Infusion über 20 bis 42 Stunden mit einer Dosis von 100 bis 700mg/m^2 Körperoberfläche.

Wie oben ausgeführt, liegt die Begründung für das erste Vorgehen darin, daß durch die hohen Plasma-MTX-Konzentrationen bei Tumoren mit fehlendem aktiven Transportmechanismus hohe intrazelluläre MTX-Konzentrationen durch passive Diffusion erreicht werden (3).

Bei 20-42-Stunden-Infusionen verfolgt man das Ziel, durch eine längere Exposition einen größeren Teil der neoplastischen Zellen in der S-Phase zu erreichen, die CF-rescue hinauszuschieben und eine Gleichgewichtseinstellung der MTX-Konzentrationen zwischen Plasma, Interstitium (z.B. Liquor) und Intrazellulärraum zu erzielen(3).

4. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

4.1. Patienten und Versuchsprotokoll

Bei 35 Patienten mit osteogenem Sarkom im Alter von 9 bis 18 Jahren wurde eine hochdosierte Methotrexattherapie durchgeführt. Die Dosis betrug zwischen 3,0 und 8,5 g/m² Körperoberfläche und wurde in 4- bis 6- stündigen Infusionen gegeben.

Bei insgesamt 138 Behandlungszyklen wurde der Verlauf der Plasma-MTX-Konzentrationen bestimmt.

Die Patienten erhielten vor, während und nach der Chemotherapie eine reichliche Hydrierung und Natriumbikarbonat zur Einstellung des Urins auf pH-Werte zwischen pH7 und pH8.

Ab der zweiten Stunde nach Ende der MTX-Infusion wurde CF in einer Dosierung von 10 bis 15 mg im Abstand von 6 Stunden insgesamt 12 mal gegeben.

Vor Therapiebeginn wurden folgende Laborparameter kon-

trolliert: Blutbild (Hämoglobin, Leukozyten und Thrombozyten), Kreatinin und Kreatinin-Clearance, Transaminasen. Zwei und zehn Tage nach der MTX-Infusion wurden diese Kontrollen nach Möglichkeit wiederholt.

Die Blutabnahme zur MTX-Spiegelbestimmung erfolgte nach 3 und 6 Stunden während der Infusion, und 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Infusionsende. Später beschränkten wir uns auf die relevanten Bestimmungen der letzten drei Werte.

Ein toxischer Verlauf wurde definiert als Knochenmarksdepression (Leukozytenzahl unter $1000/\text{mm}^3$ und/oder Thrombozytenzahl unter $100\,000/\text{mm}^3$, schwere Stomatitis und renale Toxizität (Kreatininanstieg um über 50% des Ausgangswertes). Diese Erscheinungen wurden als Zeichen einer MTX-Toxizität gewertet, wenn sie im Zeitraum von 5 bis 15 Tagen auftraten.

4.2. MTX-Bestimmung

Die Bestimmung der MTX-Plasma-Konzentrationen erfolgte durch eine radioimmunologische Methode. Auf die Grundlagen dieses Verfahrens soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

4.2.1. Grundlagen der Methode

Dem Radioimmunoassay (RIA) liegt folgendes Prinzip zu Grunde: Einer definierten, gleichbleibenden Menge von tritiiertem MTX (^3H -MTX) wird eine variable Menge unmarkiertes MTX aus Standard oder Probe zugesetzt. Diesem Gemisch wird Antiserum beigegeben, das einen für MTX spezifischen Antikörper (AK) enthält, welcher markiertes und unmarkiertes MTX mit gleich hoher Affinität bindet. Das Antiserum wird so verdünnt, daß MTX im Überschuß gegenüber den Bindungsstellen des Antiserums vorhanden ist.

Dadurch konkurrieren markierte und unmarkierte MTX-Moleküle um die Bindungsstellen der Antikörper. Sie werden im Verhältnis ihrer Konzentrationen gebunden. Bei Zugabe einer großen Menge von unmarkiertem MTX wird am Antikörper wenig ^3H -MTX gebunden; umgekehrt wird bei Zugabe einer kleinen Menge von unmarkiertem MTX die am Antikörper gebundene Radioaktivität groß sein. Die am Antikörper gebundene Radioaktivität ist somit ein Maß für die Menge des zugegebenen unmarkierten MTX (Abb.3).

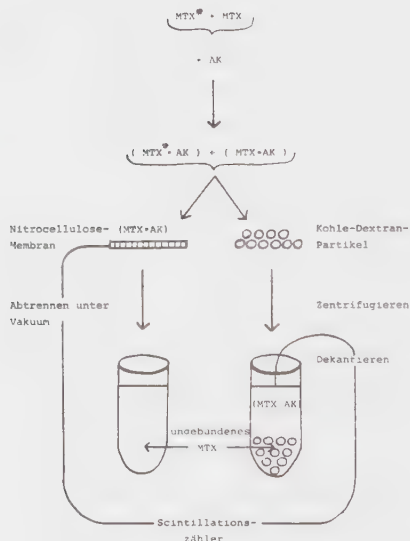


Abb.3: Prinzip des verwendeten Radioimmunoassay

MTX^* tritiiertes MTX
 MTX unmarkiertes MTX
 AK Antikörper

Zur Trennung von freiem und am Antikörper gebundenem MTX stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, z. B.:

1. Das Gemisch wird nach Einstellung des Bindungsgleichgewichtes durch eine Membran mit definierter Porengröße unter Vakuumabsaugung filtriert. Der Antikörper mit den gebundenen MTX-Molekülen verbleibt auf Grund seines hohen Molekulargewichtes auf der Membran, während das kleinmolekulare freie MTX bei einer darauffolgenden Spülung ausgewaschen wird. Die auf dem Membranfilter verbliebene gebundene Radioaktivität wird im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.
2. Bei der zweiten Abtrennungsmethode werden die freien MTX-Moleküle an einer Kohlesuspension adsorbiert. Nach anschließender Zentrifugation enthält der Überstand den Anteil MTX, der am Antikörper gebunden ist. Die Radioaktivität des Überstandes wird im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen (Abb.3).

Zur Erstellung einer Eichkurve setzt man bekannte Konzentrationen von unmarkiertem MTX ein und erhält somit einen Zusammenhang zwischen gemessener Radioaktivität und bekannter MTX-Konzentration (Abb.4).

4.2.2. Material

Die Bestimmung der Plasma-MTX-Konzentrationen bei Patienten mit Osteosarkom wurde über einen Zeitraum von zwei Jahren durchgeführt.

Zunächst wurde die Membranfiltrationsmethode nach Raso und Schreiber (24) zur Trennung von freiem und Antikörper-gebundenem MTX angewandt. Danach wurde zunächst versuchsweise die o. g. Trennungsmethode mit Kohleadsorption, die sich bei Immunoassays von Steroiden und anderen niedermolekularen Substanzen im Labor der Klinik bewährt hatte, erprobt. Sie war für MTX-Bestimmungen bereits von Roberts et al.(25) und Myers et al.(21) bei nicht immunologischen Protein-Bindungs-Methoden angewendet worden. Nach Modifikationen und Vorversuchen zeigte die Kohleadsorption bei identischen Ergebnissen bessere Reproduzierbarkeit und Praktikabilität und wurde deshalb im weiteren Verlauf der Untersuchung beibehalten.

Die Patientenproben wurden als Serum oder Citratplasma eingesetzt. Proben, die nicht sofort gemessen werden konnten, wurden bei -20°C aufbewahrt.

Zur Durchführung des MTX-RIA und zur Prüfung der Spezifität des Antiserums wurden folgende Materialien verwendet:

(3',5',9(N) - ^3H)-Methotrexat (Amersham Buchler, Braunschweig, spezifische Aktivität 14,5 Ci/mmol), MTX chemisch rein (Cyanamid, Wolfratshausen), TRIS pro analysi (Merck, Darmstadt), Norit A (Serva, Heidelberg), Dextran T 70 (Pharmacia fine chemicals, Uppsala), Gamma-Globulin vom Rind, reinst (Behringwerke, Marburg), Natrium-Acid (Merck, Darmstadt), Szintillationsflüssigkeit Quickszint 402 (Zinsser, Frankfurt), Citrovorum-Faktor und Folsäure (Serva, Heidelberg).

Zur Abtrennung mit der Membranfiltrationsmethode wurde eine Vakuumpumpe (Millipore, Neu Isenburg), ein Vielfach-Filtrationsgerät zur gleichzeitigen Filtration von 12 Proben (Millipore, Neu Isenburg) und Nitrozellulose-acetat-Filter (Millipore, Neu Isenburg, TYPE HA, $0,45\mu\text{m}$) benutzt.

Als Arbeitspuffer wurde 0,01 molarer TRIS-Puffer mit einem pH-Wert von pH 7,4 verwendet.

Für den Ansatz des Assays wurden Einmal-Glasröhrchen ($11\times 75\text{mm}$) verwendet.

Das Antiserum gegen MTX wurde durch Immunisierung von Kaninchen gegen MTX erhalten, das als Hapten an Rinderalbumin gekoppelt war. Dabei wurde das Verfahren nach Löffler et al. (19) angewendet. ^{x)}

^{x)} Für die Synthese des MTX-Protein-Konjugates sowie für die Gewinnung des Antiserums möchte ich Herrn PD Dr. F. Bidlingmaier, Univ. Kinderklinik München, danken.

Das ^3H -MTX wurde in Puffer gelöst und so verdünnt, daß 1 ml der Lösung 100 000 counts per minute (cpm) enthielt.

Zur Erstellung einer Eichkurve wurden durch Zugabe von MTX zu Normalserum Standardseren mit MTX-Konzentrationen zwischen $2,5 \times 10^{-8}$ mol/l und $2,5 \times 10^{-5}$ mol/l hergestellt. Normalserum wurde auch zur Bestimmung des Nullpunktes eingesetzt.

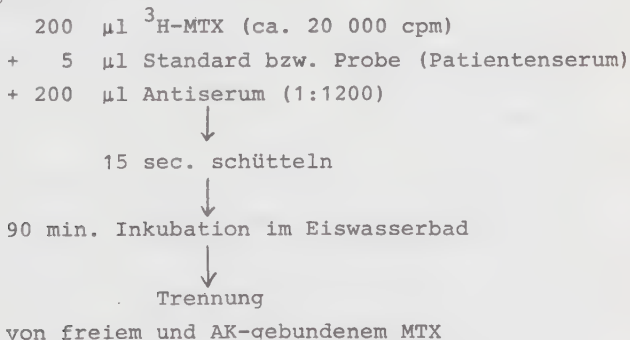
Die Kohle-Dextransuspension hatte folgende Zusammensetzung: auf 200ml Arbeitspuffer 1g Norit A, 0,1g Dextran T 70, 0,2g Gamma-Globulin, 0,064g Natrium-Acid.

Das Antiserum wurde mit Puffer 1:1200 verdünnt.

Für die Bestimmung der Radioaktivität diente ein Liquid-Szintillation Counter Tricarb 2450 (Packard, Frankfurt).

4.2.3. Durchführung

Bei der Zusammenstellung der Testansätze wurde folgendes Schema eingehalten:



Bei der Trennung wurde wie folgt verfahren:

- a) Membranfiltration: Die Testansätze wurden quantitativ auf die Filtermembranen, die unter kontinuierlichem Unterdruck standen, überführt. Nach

vollständiger Filtration wurde mit je 10ml eisgekühltem Arbeitspuffer nachgespült. Nach Trocknung der Filter im Wärmeschrank bei 90°C über 45 Minuten wurden die Filterplättchen in Szintillationsröhrchen mit 10ml Szintillationsflüssigkeit über 4 Minuten im Scintillationcounter gezählt.

- b) Kohleabsorption: Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 500µl Kohle-Dextransuspension zugegeben. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation im Eiswasserbad erfolgte Zentrifugation bei 4°C mit 1800 x g über 10 Minuten. Die Überstände der Testansätze wurden in 10ml Szintillationsflüssigkeit dekantiert und im Scintillationcounter 4 Minuten gezählt.

Proben und Standards wurden jeweils 3-fach angesetzt.

Zur Auswertung wurde das arithmetische Mittel aus den gemessenen Aktivitäten (cpm) der 3-fach-Bestimmungen gebildet. Bei jeder Meßserie wurde eine eigene Eichkurve erstellt, indem die in den Standards gemessene Radioaktivität gegen die eingegebene MTX-Konzentration aufgetragen wurde. An dieser Eichkurve wurden die unbekannten MTX-Konzentrationen der Patientenproben abgelesen (Abb.4).

Pro Meßdurchgang konnten an einer Eichkurve bis zu 30 Patientenproben bestimmt werden.

4.3. Vorversuche und Kontrollen

4.3.1. Verdünnungsfaktor des Antiserums

Die Verdünnung des Antiserums wurde so gewählt, daß die Eichkurve im relevanten Meßbereich ($2,5 \times 10^{-6}$ bis $2,5 \times 10^{-8}$ mol/l) die größte Empfindlichkeit aufweist.

Dies war bei einer Verdünnung von 1:1200 der Fall.

Damit war es möglich, die Seren, die 24, 48 und 72 Stunden nach Ende der MTX-Infusion abgenommen wurden, ohne vorherige Verdünnung zu bestimmen. Die Seren, die während oder am Ende der Infusion abgenommen wurden, mußten vor der Bestimmung 1:1000 verdünnt werden. Die Verdünnung wurde mit Normalserum durchgeführt.

Bei der verwendeten Antiserumverdünnung von 1:1200 wurde im Nullpunkt etwa 50% der eingesetzten Radioaktivität gebunden.

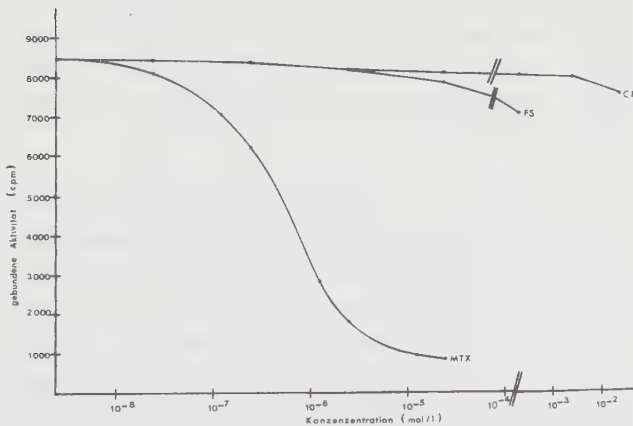


Abb.4: - Darstellung einer typischen Eichkurve (MTX)
- Darstellung der Verdrängung von markiertem MTX vom Antikörper durch Folsäure (FS) und Citrovorum-Faktor (CF) bei der Testung der Kreuzreaktivität des Antiserums

4.3.2. Inkubationsbedingungen

In Vorversuchen wurden die für eine rasche und reproduzierbare Bestimmung günstigsten Inkubationsbedingungen (Temperatur und Zeit) festgelegt.

Zur Festlegung der Inkubationszeit wurden Testansätze mit den MTX-Konzentrationen $1,25 \times 10^{-5}$ und $2,5 \times 10^{-8}$ mol/l zusammengestellt und nach 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten Inkubation im Eiswasserbad abgetrennt.

Die maximale Bindung wurde im Zeitraum zwischen 120 und 180 Minuten erreicht. Da nach 60minütiger Inkubation bereits eine Bindung von 94% bestand, konnte mit genügender Sicherheit eine Inkubationszeit von 90 Minuten festgelegt werden. Da die Zeitdifferenz von der Abtrennung von der ersten bis zur letzten Probe höchstens 10 Minuten betrug, konnte die in diesem Zeitraum nur noch geringe Zunahme der MTX-Bindung am Antikörper vernachlässigt werden (Abb.5).

Diese Versuche wurden mit beiden Abtrennverfahren durchgeführt, wobei sich kein signifikanter Unterschied herausstellte.

Zu Feststellung der günstigsten Inkubationstemperatur wurden Testansätze mit der MTX-Konzentration $1,25 \times 10^{-6}$ mol/l bei Raumtemperatur und im Eiswasserbad 60, 120, 180 und 240 Minuten lang inkubiert.

Die maximal gebundene Aktivität lag im Eiswasserbad nach 180 Minuten um 30% höher als bei Raumtemperatur. Nach 60 Minuten Inkubation waren bei Raumtemperatur bereits 80% der maximalen Bindung erreicht, im Eiswasserbad hingegen erst 63% (Abb.5).

Dies ergibt, daß die maximale Bindung bei niedrigeren Temperaturen höher ist, sich aber langsamer einstellt.

Diesen Ergebnissen entsprechend setzten wir in der Folge die Testansätze im Eiswasserbad an.

Die Inkubationszeit betrug zwischen 90 und 180 Minuten, wobei die minimale Inkubationszeit von 90 Minuten nicht unterschritten werden sollte.

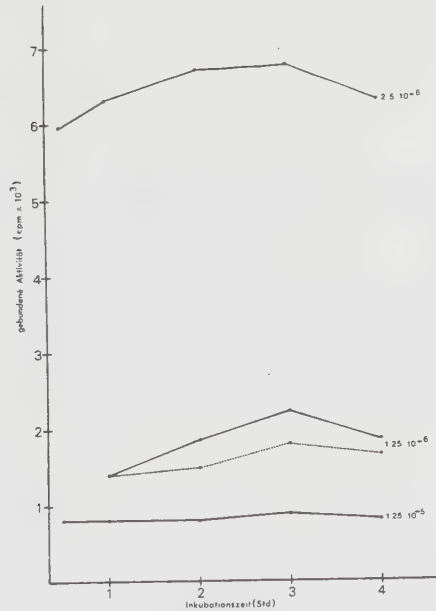


Abb.5: Darstellung der unterschiedlichen MTX-Bindung am Antikörper bei verschiedenen MTX-Konzentrationen unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen.

———— Inkubation im Eiswasserbad
..... Inkubation bei Zimmertemperatur

4.3.3. Spezifität des Antiserums

Die Spezifität des Antiserums für MTX wurde durch Testung der Kreuzreaktion gegen Citrovorum-Faktor und Folsäure überprüft.

Die Kreuzreaktion gegen Citrovorum-Faktor ist von praktischer Bedeutung, da CF im Rahmen der hochdosierten Methotrexattherapie verabfolgt wird und in Konzentrationen bis etwa 10^{-5} mol/l im Serum erscheint. Eine starke Kreuzreaktivität des Antiserums gegen CF würde damit die Ergebnisse der MTX-Bestimmungen verfälschen.

Wir stellten zu diesem Zweck Testseren her, die CF in Konzentrationen von $2,5 \times 10^{-2}$ bis $2,5 \times 10^{-8}$ mol/l enthielten; desgleichen Testseren mit Folsäure in Konzentrationen zwischen $2,5 \times 10^{-4}$ und $2,5 \times 10^{-8}$ mol/l.

Um festzustellen, inwieweit markiertes MTX vom Antikörper durch Citrovorum-Faktor bzw. Folsäure verdrängt wird, wurden im Testsystem an Stelle der MTX-Standards CF und Folsäure in steigenden Konzentrationen zugesetzt.

Weder CF noch Folsäure verursachten in Konzentrationen innerhalb der Löslichkeitsgrenze eine Verdrängung von 50%. Die Kreuzreaktivität gegen beide Substanzen liegt damit unter 0,01% ^{x)} (Abb.4).

^{x)} Die Kreuzreaktivität wurde nach der von Abraham (1) angegebenen Formel berechnet:

$$\text{Kreuzreaktivität} = \frac{\text{MTX } 50\% \quad (1)}{\text{FS } 50\% \quad (2)} \times 100 \text{ (in Prozent)}$$

(1) entspricht der MTX-Konzentration, die 50% der im Nullpunkt gebundenen Aktivität verdrängt.

(2) entspricht der Folsäure-Konzentration, die 50% der im Nullpunkt gebundenen Aktivität verdrängt.

4.3.4. Reproduzierbarkeit der Methode

Gute Reproduzierbarkeit der Methode ist entscheidend, um eine zuverlässige Aussage über eine verzögerte MTX-Ausscheidung und damit drohende Toxizität machen zu können.

Für die endgültig gewählte Trennungsmethode mit Kohlesuspension kontrollierten wir die Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie (intraassay) und von Tag zu Tag (interassay).

Die Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie kontrollierten wir durch die 12-fache Bestimmung eines Kontrollserums im gleichen Assay. Bei einem Mittelwert von $4,2 \times 10^{-7}$ mol/l MTX ergab sich hier ein intraassay-Variationskoeffizient von 3,3%.

Die Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag wurde durch Bestimmung zweier Kontrollseren verschiedener MTX-Konzentration an 12 aufeinanderfolgenden Bestimmungstagen ermittelt. Bei einem Mittelwert von $8,7 \times 10^{-7}$ mol/l MTX ergab sich ein interassay-Variationskoeffizient von 9,8%, bei einem Mittelwert von $3,5 \times 10^{-7}$ mol/l MTX betrug der Variationskoeffizient 5,1%.

Für die Abtrennungsmethode mit Membranfiltration kontrollierten wir die Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag: bei einem Mittelwert von $4,2 \times 10^{-7}$ mol/l MTX betrug der Variationskoeffizient 11,2%.

Die schlechtere Reproduzierbarkeit bei Membranfiltration läßt sich durch methodisch bedingte Ungenauigkeiten bei der Überführung des Reaktionsgemisches auf die Filtermembranen erklären.

Aus diesem Grunde wie auch aus Gründen der Kostenersparnis und der Praktikabilität wählten wir für den weiteren Verlauf der Meßperiode die Abtrennung mit Kohleabsorption.

4.4. Ergebnisse

4.4.1. Der Normbereich

Aus den Meßergebnissen von 133 klinisch atoxischen Behandlungszyklen mit hochdosierter MTX-Infusion über 6 Stunden wurde ein Wertekollektiv aufgestellt. Dieses Kollektiv umfaßt die MTX-Spiegel am Ende und 24, 48 und 72 Stunden nach Ende der MTX-Infusion.

Zur Definition des "Normbereiches", d.h. des Bereiches, in dem normaler Weise die Plasma-MTX-Konzentrationen bei atoxischen Verläufen liegen, wurde die 5., 50., und 95., Percentile gewählt. Im Bereich zwischen der 5. und 95. Percentile, der als Normbereich definiert wurde, liegen damit 90% der atoxischen Verläufe. Einen Überblick geben Abb.6 und Tabelle 1.

Die MTX-Konzentrationen am Ende der 6-stündigen MTX-Infusionen lagen zwischen $1,3 \times 10^{-4}$ mol/l (5.Percentile) und $1,2 \times 10^{-3}$ mol/l (95.Percentile). Die 50.Percentile, gleichbedeutend mit dem geometrischen Mittel, betrug $3,5 \times 10^{-4}$ mol/l.

24 Stunden nach Ende der Infusion reichte der Normbereich von 4×10^{-7} mol/l bis 4×10^{-6} mol/l. Das geometrische Mittel war $1,1 \times 10^{-6}$ mol/l.

Die 48-Stundenwerte lagen im Bereich zwischen 7×10^{-8} mol/l und $6,4 \times 10^{-7}$ mol/l mit einem geometrischen Mittelwert von $2,2 \times 10^{-7}$ mol/l.

Die untere Grenze des Normbereiches lag 72 Stunden nach Infusionsende bereits unter der Nachweisgrenze des verwendeten RIA, die bei $2,5 \times 10^{-8}$ mol/l lag. Die obere Begrenzung des Normbereiches war nach 72 Stunden 4×10^{-7} mol/l, das geometrische Mittel $8,2 \times 10^{-8}$ mol/l.

Die Breite des Normbereiches umfaßt somit zu jedem Zeitpunkt etwa eine Zehnerpotenz.

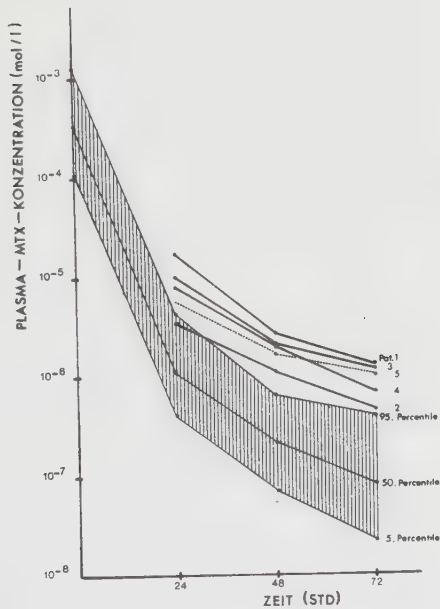


Abb.6: Darstellung des Normbereiches (schraffiertes Feld) durch die 5., 50., und 95. Percentile. Die 50. Percentile diente zur Ermittlung der durchschnittlichen Halbwertszeit. Daneben wurden die 5 Verläufe mit verzögerter MTX-Ausscheidung dargestellt. Bei Patient 1-4 entwickelte sich eine hämatologische Toxizität, Bei Patient 5 konnte dies durch verlängerte CF-therapie verhindert werden (s. Text).

MTX-Plasmakonzentration

	P e r c e n t i l e		
	5.	50.	95.
Endwert	$1,3 \times 10^{-4}$	$3,5 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-3}$
24-Stundenwert	4×10^{-7}	$1,1 \times 10^{-6}$	4×10^{-6}
48-Stundenwert	7×10^{-8}	$2,2 \times 10^{-7}$	$6,4 \times 10^{-7}$
72-Stundenwert	$<2,5 \times 10^{-8}$	$8,2 \times 10^{-8}$	4×10^{-7}

Tabelle 1: MTX-Plasmakonzentrationen (mol/l) bei 133 atoxischen Behandlungszyklen, angegeben in 5., 50., 95. Perzentile

Zur Ermittlung der mittleren Halbwertszeit der Plasma-MTX-Konzentrationen nach Infusion wurde der Verlauf der 50. Percentile (Abb.6) herangezogen und durch die Neigung der einzelnen Percentilen-Abschnitte die Halbwertszeit bestimmt. Hierzu wurden die Eckpunkte der 50. Percentile zum Zeitpunkt 0,24,48 und 72 Stunden nach Ende der MTX-Infusion geradlinig (entsprechend Abb.6) miteinander verbunden und bis zur Ordinate verlängert.

Die Konzentration des so gewonnenen Ordinatenabschnittes wurde halbiert und die Zeitspanne bis zum Erreichen der halben Konzentration abgelesen. Da die MTX-Konzentration logarithmisch aufgetragen ist, entspricht dieser Zeitraum der Halbwertszeit.

Für den Zeitraum bis 24 Stunden nach Infusionsende betrug die mittlere Halbwertszeit 3 Stunden.

Zwischen 24 und 48 Stunden nach Infusionsende war die Halbwertszeit 10,6 Stunden.

Zwischen 48 und 72 Stunden nach Infusionsende wurde eine Halbwertszeit von 16,6 Stunden ermittelt.

4.4.2. Korrelation der Plasma-MTX-Konzentrationen mit dem klinischen Verlauf

Aus Gründen, die noch weiter unten diskutiert werden, wurden die MTX-Spiegel 48 Stunden nach MTX-Infusion als Kriterien zur Vorhersage von hämatologischer Toxizität herangezogen.

Als toxischer Grenzwert zu diesem Zeitpunkt wurde der niedrigste MTX-Spiegel, dem hämatologische Toxizität nach den oben aufgeführten Kriterien folgte, angesehen. Er betrug $1,1 \times 10^{-6}$ mol/l MTX.

Daraus ergaben sich 3 Bereiche:

1. Der Normbereich (zwischen 5. und 95. Percentile)
2. Der Grenzbereich (zwischen 95. Percentile und unterhalb des toxischen Grenzwertes)
3. Der toxische Bereich (oberhalb des toxischen Grenzwertes).

Kein Patient, dessen MTX-Spiegel nach 48 Stunden im Normbereich lag, entwickelte eine hämatologische Toxizität. Bei mehreren Behandlungszyklen mit normaler MTX-Ausscheidung wurden leichte Mundulcera und/oder Transaminasenanstieg beobachtet, ohne daß hämatologische Toxizität folgte. Somit macht ein normaler MTX-Spiegel nach 48 Stunden eine schwere Knochenmarksdepression, die die gefährlichste Komplikation darstellt, sehr unwahrscheinlich. Dagegen treten leichtere Nebenwirkungen auch bei normaler MTX-Ausscheidung auf.

Bei 48 Stundenwerten über $1,1 \times 10^{-6}$ mol/l trat ohne verlängerte Leukovorintherapie hämatologische Toxizität auf:

4 von 5 Infusionszyklen mit 48-Stundenwerten im toxischen Bereich führten zu einer schweren Panzytopenie verbunden mit schwerer Stomatitis. Bei einem Patienten konnte noch nach 10 Tagen ein MTX-Spiegel von $8,5 \times 10^{-8}$ mol/l gemessen werden (Tab.2).

Bei 1 von 5 Infusionszyklen mit verzögerter MTX-Ausscheidung konnte bei rechtzeitigem Vorliegen des 48-Stundenwertes durch verlängerte CF-Gabe die Entwicklung einer Knochenmarksdepression verhindert werden. CF wurde 9 Tage lang in unveränderter Dosierung gegeben. Am 7. Tag nach Infusion wurde noch ein MTX-Spiegel von 9×10^{-8} mol/l gemessen (Tab.2).

Den Bereich zwischen 95. Percentile und toxischem Grenzwert definierten wir als Grenzbereich. Bei keinem von

Patient Nr.	Methotrexat- dosis	Toxizität			Methotrexatspiegel (mol/l)		
		Leuko- zyten/mm ³	Thrombo- zyten/mm ³	Stoma- titis	24 Std. oberer Normbereich 4 x 10 ⁻⁶	48 Std. Normbereich 6,4 x 10 ⁻⁷	72 Std. 4 x 10 ⁻⁷
1	8g/m ²	200	1000	schwer	1,75 x 10 ⁻⁵	2,75 x 10 ⁻⁶	1,3 x 10 ⁻⁶
2	6g/m ²	600	12000	schwer	3,7 x 10 ⁻⁶	1,1 x 10 ⁻⁶	4,6 x 10 ⁻⁷
3	6g/m ²	600	25000	schwer	1,0 x 10 ⁻⁵	2,1 x 10 ⁻⁶	1,3 x 10 ⁻⁶
4	8g/m ²	300	31000	mild	7,75 x 10 ⁻⁶	2,0 x 10 ⁻⁶	7,0 x 10 ⁻⁷
5	5g/m ²	1400	202000	keine	5,7 x 10 ⁻⁶	1,7 x 10 ⁻⁶	1,0 x 10 ⁻⁶

Tabelle 2: Methotrexatinfusionen mit schwerem toxischem Verlauf (Pat. 1 - 4)
und verzögerter MTX-Ausscheidung ohne hämatologische Toxizität (Pat. 5)

5 Patienten, deren 48-Stundenwerte im Grenzbereich ($6,4 \times 10^{-7}$ bis unter $1,1 \times 10^{-6}$ mol/l MTX) lag, wurde hämatologische Toxizität nach unseren Kriterien beobachtet. Bei diesen Patienten waren die 72-Stundenwerte im Normbereich.

4.4.3. Serum-Kreatininspiegel und MTX-Toxizität

Es wurde ferner untersucht, ob man einen Anstieg des Serumkreatininspiegels (48 Stunden nach Infusion gegenüber dem Ausgangswert vor MTX-Gabe) als Kriterium zur Vorhersage einer verzögerten MTX-Ausscheidung und damit drohenden Toxizität heranziehen könne. Da der verzögerte Abfall der Plasma-MTX-Konzentration in den meisten Fällen auf eine Nierenschädigung zurückgeführt wird, könnte ein Kreatininanstieg einen Hinweis darauf geben.

Zur Untersuchung dieses Zusammenhanges standen bei 72 von 133 atoxischen und bei 3 von 5 Behandlungszyklen mit verzögerter Ausscheidung die entsprechenden Kreatininbestimmungen zur Verfügung.

Dabei ergab sich bei 8 von 72 atoxischen Verläufen ein Kreatininanstieg von mehr als 50% (50% bis 360%) (Tab.3).

Bei 5 Verläufen mit verzögerter Ausscheidung wurde einmal ein Kreatininanstieg von mehr als 50%, zweimal kein signifikanter Kreatininanstieg beobachtet. Bei 2 toxischen Zyklen lag kein Kreatininwert nach MTX-Gabe vor (Tab.3).

MTX-Ausscheidung	Zahl der Fälle	Kreatininanstieg		
		> 50 %	< 50 %	nicht bestimmt
Normal	133	8	64	61
Verzögert	5	1	2	2

Tabelle 3: Zusammenhang zwischen MTX-Ausscheidung und Kreatininanstieg im Zeitraum bis 48 Stunden nach Ende der MTX-Infusion

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

5.1. Zum Normbereich

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand darin, eine Methode aufzubauen, mit deren Hilfe eine verzögerte MTX-Ausscheidung und damit drohende MTX-Toxizität rechtzeitig vorhergesagt werden kann. Diese Aussage muß spätestens 72 Stunden nach Infusionsende möglich sein, da bei der hochdosierten MTX-Therapie zu diesem Zeitpunkt die Entscheidung über die Beendigung bzw. Fortführung der Leukovorintherapie getroffen wird.

Die vorliegende Methode des RIA ermöglicht es, die 48-Stundenwerte innerhalb eines Zeitraumes von 6 bis 8 Stunden zu bestimmen.

Die routinemäßige Leukovorintherapie, die 72 Stunden nach Infusionsende abgesetzt wird, besitzt die nötige Sicherheitsspanne, um das Auftreten von Toxizität bei normaler Ausscheidung zu verhindern. Mehrere Punkte sprechen gegen eine Verlängerung der routinemäßigen CF-Gabe, um auch bei verzögerter Ausscheidung die Entwicklung von Toxizität zu verhindern. MTX-Konzentrationen über dem toxischen Schwellenwert (2×10^{-8} mol/l) wurden bis zu 10 Tage nach Infusion gemessen. Das bedeutet, daß CF routinemäßig bis zu diesem Zeitpunkt gegeben werden müßte. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß durch die Verlängerung der CF-rescue nicht doch Tumorzellen "gerettet" werden und dadurch der therapeutische Effekt von MTX verschlechtert würde. Außerdem würde die Verlängerung der CF-Gabe eine nicht unerhebliche Mehrbelastung für den Patienten darstellen, da die Leukovorintabletten alle 6 Stunden eingenommen werden müssen. Nicht zuletzt würden die Kosten der Therapie erheblich ansteigen.

Der Normbereich wurde charakterisiert durch die 5., 50., und 95. Percentile der gemessenen Plasma-MTX-Konzentrationen. Die Darstellung durch Mittelwert $\pm$ 2 SD ergab keinen sinnvollen Normbereich, da die unteren Grenzen ($\bar{x}$ - 2 SD) kleiner als Null waren. Dies läßt sich dadurch erklären, daß das ermittelte Wertekollektiv keine Normalverteilung aufweist.

Der in dieser Arbeit gefundene Normbereich wurde aus den Werten unserer 2-jährigen Meßperiode ermittelt. Die Daten stimmen gut mit den Meßergebnissen von Stoller et al. (28) und Sauer und Schalhorn (27) überein, die zur Messung der Plasma-MTX-Konzentrationen eine Dihydrofolsäurereduktase-Methode bzw. einen Assay mit kompetitiver Proteinbindung benützten.

Der von Stoller et al. angegebene toxische Grenzwert von 9×10^{-7} mol/l nach 48 Stunden hat sich auch bei unseren Untersuchungen als zutreffend erwiesen: Bei keinem von 133 Infusionszyklen, deren 48-Stunden-MTX-Konzentration unter 9×10^{-7} mol/l lag, folgte hämatologische Toxizität.

Nach 4 von 5 Infusionszyklen mit 48-Stundenwerten größer/gleich $1,1 \times 10^{-6}$ mol/l trat hämatologische Toxizität auf; da die MTX-Spiegel-Bestimmung bei diesen Patienten in der Anfangsphase unserer Studie aus technischen Gründen erst nach Beendigung der CF-Applikation durchgeführt werden konnte, erhielten diese 4 Patienten keine erhöhte oder verlängerte CF-Therapie.

Einer von 5 Patienten mit verzögerter Ausscheidung erhielt bei rechtzeitigem Vorliegen der MTX-Spiegel eine verlängerte CF-Therapie, wobei die Einzeldosis nicht gesteigert wurde. Eine hämatologische Toxizität nach unseren Kriterien trat nicht auf.

Von Isacoff et al. (13) wurde der 24-Stundenwert als Kriterium zur Vorhersage von hämatologischer Toxizität vorgeschlagen.

Dieses Vorgehen hat sich uns als nicht zuverlässig erwiesen: Bei 1 von 5 Fällen mit verzögerter Ausscheidung lag der 24-Stundenwert im Normbereich. Durch alleinige Bestimmung des 24-Stundenwertes wäre dieser toxische Verlauf nicht erkennbar gewesen. Umgekehrt zeigte 1 Patient einen erhöhten 24-Stundenwert, danach aber eine rasche Ausscheidung, sodaß der 48-Stundenwert im Grenzbereich lag; eine Knochenmarksdepression trat nicht auf.

Auch die erreichbaren MTX-Spiegel am Ende der Infusion ergaben keine verwertbaren Kriterien zur zeitgerechten MTX-Ausscheidung.

Bei der Ermittlung der Halbwertszeiten der Plasma-MTX-Konzentrationen wurden aus praktischen Gründen die Intervalle zwischen 0 und 24, 24 und 48, und 48 und 72 Stunden nach Infusionsende herangezogen.

Auf diese Weise ergaben sich drei voneinander verschiedene Halbwertszeiten:

Die erste Halbwertszeit von 3 Stunden entspricht etwa der von Stoller et al. (29) angegebenen ersten Halbwertszeit von $2,06 \pm 0,16$ Stunden; Stoller et al. gibt bei der MTX-Ausscheidung nach hochdosiertem Methotrexat einen biphasischen Verlauf der MTX-Ausscheidung an. Er sieht in dieser ersten Phase eine Entsprechung zu der oben zitierten zweiten Halbwertszeit (12), wobei die erste kurze Halbwertszeit von 0,75 Stunden unberücksichtigt bleibt. Dementsprechend können wir unsere erste Phase der MTX-Elimination mit einer Halbwertszeit von 3 Stunden mit der Verteilung und Ausscheidung von MTX interpretieren. Die von uns ermittelten Halbwertszeiten von 10,6 Stunden bzw. 16,6 Stunden lassen sich mit der von Stoller et al. (29) angegebenen zweiten Phase der MTX-Ausscheidung

(Halbwertszeit 10,4 Stunden) in Einklang bringen. Stoller et al. beobachtete diese zweite Phase der MTX-Elimination frühestens 30 Stunden nach MTX-Gabe. Die Diskrepanz zu den Angaben von Huffman et al. (12) (Halbwertszeit von 26,99 Stunden) erklärt sich durch die unterschiedlichen MTX-Dosierungen (-die Angaben von Huffman et al. beziehen sich auf konventionell niedrig dosierte MTX-Therapie -) oder die geringere Spezifität der von Huffman et al. eingesetzten Bestimmungsmethode.

5.2. Serum-Kreatinin und MTX-Toxizität

Von Pitman et al. (23) wurde die Serum-Kreatininbestimmung zur Vorhersage einer verzögerten Ausscheidung von MTX vorgeschlagen.

Als Kriterium wurde ein Kreatininanstieg um 50% des Ausgangswertes bis zum 2.Tag nach Infusion angenommen.

Aus den oben genannten Ergebnissen der Kreatininbestimmungen und den klinischen Verläufen folgt, daß die alleinige Kreatininbestimmung ohne MTX-Messung keinen verlässlichen Anhalt für die Voraussage einer hämatologischen Toxizität darstellt, da nur ein Teil der Verläufe mit verzögerter Ausscheidung erfaßt wird. Dies stimmt mit den Angaben von Stoller et al. (28) und Isacoff et al. (13) überein. Umgekehrt wird nur bei einem Teil der Verläufe mit Kreatininanstieg eine Toxizität beobachtet; die unnötige Verlängerung der CF-Gabe könnte sich auf den therapeutischen Effekt der MTX-Therapie negativ auswirken.

5.3. Leitlinien zur Behandlung

An Hand unserer Ergebnisse schlagen wir für die Behandlung folgendes Vorgehen vor:

Liegt der 48-Stundenwert im Normbereich, kann CF nach 72 Stunden ohne Gefahr abgesetzt werden. Bei 48-Stundenwerten im Grenzbereich wird bis zum Vorliegen des 72-Stundenwertes CF weiter gegeben. Liegt dieser Wert im Normbereich, kann CF abgesetzt werden.

Bei 48-Stundenwerten im toxischen Bereich muß die CF-Therapie, u.U. in höherer Dosierung, fortgeführt werden. Dabei wird der MTX-Spiegel im Plasma alle 24 Stunden gemessen und die CF-Therapie erst nach Erreichen eines MTX-Spiegels von 9×10^{-8} mol/l beendet (3).

5.4. Zur Leukovorin-Therapie

Zur Dosierung des Leukovorins bei der CF-rescue stellen sich zwei Fragen:

1. Ist die Leukovorindosis, wie sie in den meisten Therapieschemen angewandt wird, ausreichend?
2. Wie hoch muß Leukovorin bei Patienten mit verzögerter MTX-Ausscheidung dosiert werden?

Modelluntersuchungen an Lymphoblastenkulturen haben gezeigt, daß eine wirksame Korrektur der DNS-Synthese erst erreicht wird, wenn die Konzentration von CF die MTX-Konzentration um das 10-fache übersteigt (27).

Bei der herkömmlichen Leukovorindosierung von 15mg alle 6 Stunden werden Plasmaspiegel von CF und dem wichtigsten Metaboliten, 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, zwischen 10^{-5} und 10^{-6} mol/l erreicht (27, 8).

Daraus folgt, daß bei der o.g. Leukovorindosierung eine Normalisierung der DNS-Synthese erst bei Plasma-MTX-Konzentrationen zwischen 10^{-6} und 10^{-7} mol/l eintritt. Dies ist bei zeitgerechter MTX-Ausscheidung etwa 40 Stunden nach Infusionsende der Fall.

Eine Knochenmarkstoxizität ist erst bei einer MTX-Exposition, die die kritische Zeitschwelle von 42 Stunden übersteigt, zu erwarten (18). Da aber bei Überschreiten der Zeitschwelle die CF-rescue bereits wirksam ist, ist bei normaler MTX-Ausscheidung eine Knochenmarksdepression nicht zu befürchten.

Dies wurde durch Bestimmung des Einbauquotienten von $^3\text{HdUR}/^3\text{H-dTR}$ x) in Knochenmarkszellen, der ein Parameter des DNS-Stoffwechsels ist, nach hochdosierter MTX-Therapie bestätigt:

Der Quotient begann sich zu normalisieren, nachdem der Plasma-MTX-Spiegel unter 10^{-6}mol/l gefallen war. Daraus läßt sich schließen, daß die Leukovoringaben vor diesem Zeitpunkt nicht unbedingt erforderlich wären (27).

Für die vollständige Verhinderung einer MTX-Toxizität bei verzögerter Ausscheidung ist zum Zeitpunkt des Überschreitens der kritischen Zeitschwelle ein bereits ausreichender CF-Schutz erforderlich.

Bei herkömmlicher CF-Dosierung müßte demnach der MTX-Spiegel nach 42 Stunden um oder unter 10^{-6}mol/l liegen, da bei einem Leukovorinspiegel von 10^{-5}mol/l die Plasma-MTX-Konzentration höchstens ein Zehntel des Leukovorinspiegels betragen soll. Dies ist bei verzögerter MTX-Ausscheidung häufig nicht der Fall.

Trotzdem bietet eine alleinige Verlängerung der CF-Applikation ohne Dosiserhöhung einen Schutz vor Knochen-

x) $^3\text{H-dUR}/^3\text{H-dTR}$ ist ein Quotient, der quantifiziert, in welchem Maße in der durch MTX geschädigten Zelle der o.g. "salvage pathway" beschritten wird.

$^3\text{H-dUR}$ = mit Tritium markiertes Deoxyuridin

$^3\text{H-dTR}$ = mit Tritium markiertes Thymidin

marksdepression, da zwar die CF-rescue erst verspätet voll wirksam wird, aber der lange Zeitraum (bis zu 10 Tagen!), in dem noch MTX-Spiegel über 10^{-7} mol/l vorliegen, durch wirksame CF-Spiegel abgedeckt ist. Auf diese Weise läßt sich erklären, daß bei Patient 5 (Tabelle 2) durch alleinige Verlängerung der Leukovorintherapie die Entwicklung einer Knochenmarksdepression verhindert wurde.

Zur Erzielung einer Sicherheitsspanne wäre im Falle einer verzögerten MTX-Ausscheidung eine Steigerung der Leukovorindosierung ("high-dose-rescue") notwendig (27). Diese hohen CF-Dosen könnten allerdings durch passive Diffusion auch einen "rescue-Effekt" auf Tumorzellen ohne Carrier-System für MTX und CF ausüben.

Leukovorin verteilt sich wie MTX in 76% des Gesamt-Körpervolumens. Unter der Annahme, daß zur wirkungsvollen CF-rescue das Konzentrationsverhältnis CF:MTX sich wie 10:1 verhalten soll, geben Sauer und Schalhorn (27) zur Leukovorin-Dosierung folgende Formel an:

$$CF = 10 \times |MTX| \times 0,76 \times KG \quad x)$$

x) CF = CF-Dosierung in mg, alle 6 Stunden i.v.

|MTX| = Plasma-MTX-Konzentration in mg/l

KG = Körpergewicht in kg

Zur Umrechnung der Plasma-MTX-Konzentration von mg/l in mol/l gilt näherungsweise:

$$|MTX| \text{ (mg/l)} = \frac{MTX \text{ (mol/l)}}{10^{-6}} \times 0,5$$

Die vorliegende Methode bietet die Möglichkeit, eine verzögerte MTX-Ausscheidung rasch und zuverlässig zu erfassen. Andere Kriterien alleine haben sich als nicht zuverlässig erwiesen.

Die Schwere der toxischen Komplikationen macht die Bestimmung der MTX-Spiegel im Plasma bei der hochdosierten MTX-Therapie notwendig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Radioimmunoassay beschrieben, mit dessen Hilfe bei 138 Therapiezyklen mit hochdosiertem Methotrexat die Pharmakokinetik dieses Zytostatikums untersucht wurde.

Die Spezifität des Antiserums wurde durch den Nachweis einer nur sehr geringen Kreuzreaktivität gegen Citrovorum-Faktor und Folsäure bestätigt.

Bei 5 von 138 Methotrexatinfusionen wurde ein verzögerter Abfall der Plasma-Methotrexatkonzentrationen mit teilweise lebensbedrohlichen Nebenwirkungen beobachtet.

Der Methotrexatspiegel im Serum 48 Stunden nach Infusionsende erwies sich als zuverlässiger Parameter zur Vorhersage toxischer Nebenwirkungen.

Im Gegensatz dazu konnte durch Bestimmung des Serum-Kreatinins ein Verlauf mit toxischen Nebenwirkungen nicht vorhergesagt werden.

Die Grundlagen der hochdosierten Methotrexat-Therapie wurden dargestellt.

An Hand der erhobenen pharmakokinetischen Daten lassen sich Richtlinien für die anschließende Leukovoringabe ableiten.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Abraham G.E.: Radioimmunoassay of steroids in biological materials
Acta Endocrinol.: Suppl. 183 (1974)
- 2) Bertino J.R.: "Rescue" Techniques in Cancer Chemotherapy: Use of Leucovorin and Other Rescue Agents After Methotrexate Treatment.
Sem. Oncol. 4: 203 - 216 (1977)
- 3) Bleyer W.A.: The clinical pharmacology of methotrexate
Cancer 41: 36 - 51 (1978)
- 4) Chabner B.A., Young R.C.: Threshold methotrexate concentration for in vivo inhibition of DNA synthesis in normal and tumorous target tissues
J.Clin.Invest. 52: 1804 - 1811 (1973)
- 5) Djerassi J., Farber S., Abir E., Neikirk W.: Continuous infusion of methotrexate in children with acute leukemia
Cancer 20: 233 (1967)
- 6) Farber S., Diamond L.K., Mercer R.D., Sylvester R.F., Wolff V.A.: Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic antagonist 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin).
N.Engl.J.Med. 238: 787 - 793 (1948)
- 7) Frei E. III, Jaffe N., Tattersall M., Pitman S., Parker L.: New approaches to cancer chemotherapy with methotrexate
N.Engl.J.Med.: 292: 846 - 851 (1975)
- 8) Goldman D.: Membrane transport of methotrexate (NSC-740) and other folate compounds: relevance to rescue protocols
Cancer Chemotherapy Rep. 6: 62 - 72 (1975)
- 9) Hoff D.D.von, Penta J.S., Helman L.J., Slavik M.: Incidence of drug-related deaths secondary to high-dose methotrexate and citrovorum factor administration
Cancer Treat.Rep.61: 745 - 748 (1977)
- 10) Hofflerend A.V., Tripp E.: Unbalanced deoxyribonucleotide synthesis caused by methotrexate
Br.Med.J. 2: 140 - 142 (1972)

- 11) Hryniuk W.M., Bertino J.R.: Treatment of leukemia with large doses of methotrexate and folinic acid: clinical-biochemical correlates
J.Clin.Invest. 48: 2140 - 2155 (1969)
- 12) Huffman D.H., Wan S.H., Azarnoff D.L., Hoogstraten B.: Pharmacokinetics of methotrexate
Clin.Pharmacol.Ther. 14: 572 - 579 (1973)
- 13) Isacoff W.H., Townsend Jr. C.M., Eilber F.R., Forster T., Morton D.L., Block J.B.: High dose methotrexate therapy of solid tumors: observations relating to clinical toxicity
Med.Pediatr.Oncol. 2: 319 - 325 (1976)
- 14) Jacobs S.A., Stoller R.G., Chabner B.A., Johns D.G.: Dose-dependent metabolism of methotrexate in man and rhesus monkeys
Cancer Treat.Rep. 61: 651 - 656 (1977)
- 15) Jaffe N., Frei E., Traggis D., Bishop Y.: Adjuvant methotrexate and citrovorum-factor treatment of osteogenic sarcoma
N.Engl.J.Med. 291: 994 - 997 (1974)
- 16) Jaffe N., Frei E., Watts H., Traggis D.: High dose methotrexate in osteogenic sarcoma: a 5 year experience
Cancer Treat.Rep. 62: 259 - 264 (1978)
- 17) Juergens H., Kosloff C., Nirenberg A., Metha B.M., Huvos A.G., Rosen G.: Clinical and pharmacokinetic prognostic factors in the response of primary osteogenic sarcoma to preoperative chemotherapy
Unveröffentlichtes Manuskript
- 18) Levitt M., Mosher M.B., DeConti R.C., Farber L.R., Skeel R.T., Marsh J.C., Mithcell M.S., Papac R.J., Thomas E.D., Bertino J.R.: Improves therapeutic index of methotrexate with "leucovorinrescue"
Cancer Res. 33: 1729 - 1734 (1973)
- 19) Loeffler L.J., Blum M.R., Nelsen M.A.: A radio-immunoassay for methotrexate and its comparison with spectrofluorimetric procedures
Cancer Res. 36: 3306 - 3311 (1976)
- 20) Marcove R.C., Mike V., Hajek J.V., Levin A.G., Hutler R.V.: Osteogenic sarcoma under the age of twenty-one: a review of one hundred and forty-five operative cases
J.Bone Joint Surg. 52: 411 - 423 (1970)

- 21) Myers C. E., Lippman M. E., Eljot H. M., Chabner B. A.: Competitive protein binding assay for methotrexate
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 9: 3683 - 3686 (1975)
- 22) Pitman S. W., Frei E.III: Weekly methotrexate-calcium leucovorin rescue: effect of alkalinization on nephrotoxicity; pharmacokinetics in the CNS; and use in CNS non-Hodgkin's lymphoma
Cancer Treat. Rep. 61: 695 - 701 (1977)
- 23) Pitman S. W., Parker L. M., Tattersall M.H.N., Jaffe N., Frei E.III: Clinical trial of high-dose methotrexate (NSC-740) with citrovorum factor (NSC-3590) - toxicologic and therapeutic observations
Cancer Chemotherapy Rep. 6: 43 - 49 (1975)
- 24) Raso V., Schreiber R.: A rapid and specific radio-immunoassay for methotrexate
Cancer Res. 35: 1507 (1975)
- 25) Roberts D., Kidd W., Pratt C.B., Peck C., Grinnel J.: Serum Levels of Methotrexate by the Ligandbinding Assay after "high-dose"Therapy for Osteosarcoma
Cancer 44: 881 - 890 (1979)
- 26) Rosen G., Marcove R.C., Caparros B., Nirenberg A., Kosloff C., Huvos A.G.: Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery
Cancer 43: 2163 - 2177 (1977)
- 27) Sauer H., Schalhorn A: Rationale Grundlagen und Praxis des Citrovorumfaktor (Leukovorin^R)-Schutzes nach hochdosierter Methotrexat^R-Therapie
Manuskript noch nicht in Druck
- 28) Stoller R.G., Hande K. R., Jacobs S. A., Rosenberg S.A., Chabner B.A.: Use of plasma pharmacokinetics to predict and prevent methotrexate toxicity
N. Engl. J. Med. 297: 630 - 634 (1977)
- 29) Stoller R.G., Jacobs S.A., Drake J.C., Lutz R.J., Chabner B.A.: Pharmacokinetics of high-dose methotrexate (NSC-740)
Cancer Chemother. Rep. 6: 19 - 24 (1975)
- 30) Valerino D.M., Johns D.G., Zaherco D.S., Olivero V.T.: Studies on the metabolism of methotrexate by intestinal flora. Identifikation and study of the biological properties of the metabolite 4-amino-4-deoxy-N¹⁰-methyl-ptericoic acid
Biochem. Pharmacol. 21: 821 - 831 (1972)

- 31) Waters K.D.: Treatment of osteosarcoma
Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology
Suppl. 5: 11 - 16 (1979)
- 32) Wilmanns W.: Die Tymidin-Kinase in normalen und leu-
kämischen myeloischen Zellen
Klin. Wschr. 45: 505 - 511 (1967)

Herrn Prof. Dr. K. Betke, dem Direktor der Universitätskinderklinik in München, möchte ich dafür danken, daß er es mir ermöglicht hat, in seiner Klinik diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. F. Bidlingmaier für die vielen wertvollen Hinweise und die Hilfe bei der Durchführung der biochemischen Untersuchungen.

Sehr herzlich danken möchte ich Frau Dr. G.E. Janka für die Themenstellung zu dieser Arbeit und die hilfreiche Betreuung, besonders des klinischen Teiles.

Für das fördernde Interesse und Diskussionen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. R.J. Haas.

LEBENS LAUF

Herbert Wiesner

Geboren: 8. August 1954 in München
Vater: Dr. Richard Wiesner, Physiker
Mutter: Rosa Wiesner, Phys. techn. Assistentin

1960 - 1964	Volksschule - Wittelsbacherstraße, München
1964 - 1973	Wilhelmsgymnasium, München
1973	Abitur
1973 - 1980	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1975	Ärztliche Vorprüfung
1976	1. Teil der Ärztlichen Prüfung
1979	2. Teil der Ärztlichen Prüfung
1979 - 1980	Praktisches Jahr an der Dermatologischen Klinik in München, an der Internen Abtei- lung des Kreiskrankenhauses Starnberg, an der Chirurgischen Abteilung des Stadtkran- kenhauses Traunstein
1980	3. Teil der Ärztlichen Prüfung

